

DE10010113 [Bibli](#) [Desc](#) [Claims](#) [Drawing](#)

**Isolation of collagen by extraction from sponge, giving product having cyclooxygenase inhibiting activity, useful for treating inflammatory diseases such as arthritis or skin inflammation**

Patent Number: DE10010113

Publication date: 2001-09-13

Inventor(s):

G (DE); SWATSCHEK DIETER (DE)

Applicant(s):

SCHATTON WOLFGANG (DE)

Requested

Patent:

☐ [DE10010113](#)

Application

Number:

DE20001010113 20000303

Priority

Number(s):

DE20001010113 20000303

IPC Classification: C07K14/78; B01J2/08; A61K7/00; A61K38/39

EC Classification: [A23J1/04](#), [A61L15/32A](#), [A61L27/24](#), [C08H1/00](#), [C08L89/00](#), [C09H1/00](#)

Equivalents:

AU3741701, ☐ [WO0164046](#)**Abstract**

Isolation of sponge collagen (I) involves placing the starting material in alcohol, washing, treating with an extractant and working up the obtained collagen extract. An independent claim is also included for the preparation of nanoparticulate collagen (II) by dispersing and homogenizing a starting collagen material, emulsifying, crosslinking using an excess of crosslinking agent and working up.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

DE10010113 **Bibli** **Desc** **Claims** **Drawing**

## Description

Die vorliegende Anmeldung betrifft das in den Ansprüchen beschriebene Verfahren zur vereinfachten und damit industriell nutzbaren Isolierung von Schwammkollagen, insbesondere aus marinen Schwämmen, insbesondere aus Schwämmen der Klasse der Chondrosiidae, sowie die Herstellung von Kollagen nanopartikeln aus Kollagen.

Ferner betrifft die Anmeldung die Verwendung von derart isoliertem Kollagen bzw. von Kollagen nano- und -mikropartikeln zur Herstellung von Cremes, Salben, zur Anwendung auf Haut und Schleimhäuten, Suspensionen, Tabletten, Kapseln, auch mit verzögerter Freisetzung, Implantate, Pflastern, Schäumen u. a. zur Wundabdeckung, Wirkstoffträger in Parenteralia und Enteralia, Augentropfen, Nanokapseln als Wirkstoffträger und Carrier für Wirkstoffe durch Haut und Schleimhäute sowie Gefäss und Organmembranen.

Kollagen ist ein bioabbaubares und gut verträgliches Protein und findet es als Ausgangsmaterial breite Anwendung in der pharmazeutischen Industrie, Kosmetik und Lebensmittelchemie.

Bislang wurde Kollagen aus Tierhäuten - und Knochen von Schweinen, Kälbern und Rindern gewonnen. Dabei stellte die Möglichkeit, den Anwender durch pathogene Keime, Viren und vor allen Dingen mit BSE (Bovine - spongiforme - Enzephalopathie) zu infizieren, einen entscheidenden Nachteil dar.

Schwämme sind über 600 Millionen Jahre alt und stellen somit die ältesten Vertreter aus der Gruppe der Metazoen dar. Wie alle vielzelligen Tiere besitzen Schwämme das Bindegewebsprotein Kollagen. Schwammkollagen stellt ein wasserunlösliches Protein dar, welches die typische Aminosäurezusammensetzung von bekannten Kollagentypen besitzt. So stellt u. a. Glycin etwa jede dritte Aminosäure dar und die Anteile an Prolin sowie Hydroxyprolin sind hoch.

Schwammkollagen kann nach verschiedenen Methoden isoliert werden. Dabei wurde bislang, wenig praxisnah, Frischmaterial eingesetzt. Das Reinigungsverfahren für derartig isoliertes Schwammkollagen war bislang aus industrieller Sicht meist relativ aufwendig (z. B. Gelfiltration). Auch die Ausbeute war noch nicht zufriedenstellend. So wurden z. B. aus 1000 g Schwamm-Material 21 g Schwammkollagen isoliert.

Dies beschreiben B. Diehl Seufert et al. in J. Cell Sc. 79, 271-85 (1985). Die Isolierung von Kollagen aus dem Schwamm *Geodia cydonium* und *Chondrosia reniformis* mit natürlicher Aminosäurezusammensetzung unter Vermeidung von Denaturierungsreagentien erfolgt durch Suspendierung von homogenisiertem frischen Material in Tris-HCl Puffer, pH-Wert Einstellung auf 9, Zentrifugation und Homogenisierung. Die Reinigung erfolgt durch Gelfiltration, wobei wie erwähnt 1,7 bzw. 3,1% Kollagen erhalten werden.

Es besteht daher Bedarf an einem einfachen und wirtschaftlichen Verfahren zur Isolierung von Kollagen aus Schwämmen, wobei die Nachteile für aus tierischem Ausgangsmaterial gewonnenem Kollagen vermieden und gleichzeitig hohe Ausbeuten erzielt werden.

Darüberhinaus ist es von Vorteil, insbesondere kleipartikuläres Kollagen herzustellen.

Die Herstellung von Kollagenmikropartikeln wurde bisher für natives Kalbskollagen beschrieben. Es war dabei jedoch nur möglich, Mikropartikel im Grössenbereich von 3 bis 40 µm herzustellen, so wie in B. Rossler, J. Kreuter und D. Scherer *Collagen microparticles, preparation and properties*, J. Microencapsulation, Vol. 12, No. 1, 49-57 (1995) beschrieben. Dieser Grössenbereich ist für pharmazeutische und kosmetische Anwendungen aber weniger geeignet. Bei einer intravenösen Anwendung besteht die Gefahr einer Embolie, bei der Anwendung auf der Haut oder am Auge wird die Freigabe von daran gebundenen Stoffen verlangsamt, sodass diese nicht innerhalb nützlicher Zeit erfolgt, das heisst, bevor die Zubereitung abgewaschen, bzw. durch Drainage aus dem Auge entfernt wird. Ausserdem kann durch die relativ grosse Teilchengrösse ein unangenehmes kratzendes Gefühl erzeugt werden. Aus diesem Grunde ist es notwendig, den Grössenbereich zu beschränken, das heisst unter 3 µm oder kleiner zu halten.

Aufgabe vorliegender Anmeldung ist es daher, eine produktorientierte Isolierungsmethode für Schwammkollagen zu entwickeln, welche einfach und effektiv in guten Ausbeuten zu einem Produkt mit hohem Kollagenanteil führt, wobei ein minimales toxikologisches Risiko bestehen soll. Gleichzeitig soll das Ausgangsmaterial kostengünstig und praxisnah konserviert sein, so dass dabei auf die Zugabe von tiefgefrorenem Frischmaterial als Ausgangsmaterial verzichtet werden kann (wie es bisher eingesetzt war).

Ferner sollen Kollagenpartikel hergestellt werden, die eine möglichst geringe Grösse, insbesondere im mikro- und nano-Bereich, aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss gelöst, indem man das frische Ausgangsschwammmaterial, welches nicht gefroren sein muss, in Alkohol einlegt, anschliessend mit Wasser wäscht und mit einem Extraktionsmittel, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7-12, insbesondere 8-10, ganz besonders 9-9,5 versetzt, den resultierenden Kollagenextrakt aufarbeitet. Dies erfolgt vorzugsweise durch Erhöhung des pH-Wertes der Suspension auf pH 8-11, insbesondere 9-10, bevorzugt 9, Rühren, Zentrifugation und anschliessende durch Verringerung des pH-Wertes des Überstands, Zentrifugation und Isolierung des Präzipitats.

Durch diese Vorgehensweise erübrigt sich eine weitere Aufreinigung wie z. B. durch Gelfiltration oder ähnliches. Dabei wird gereinigtes Kollagenprodukt, welches gewünschtenfalls zur Konservierung gefriergetrocknet werden kann, in einer hohen Ausbeute erhalten.

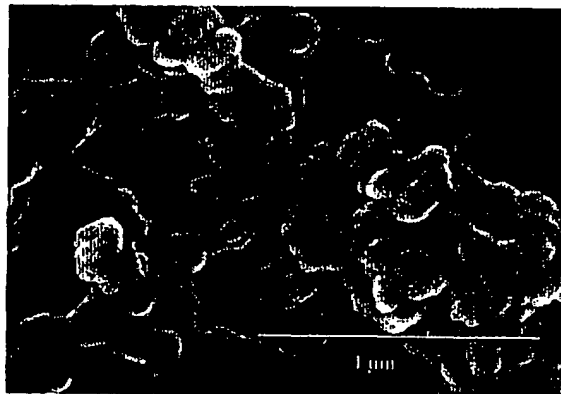
DE10010113 **Bibli** **Desc** **Claims** **Drawing****Claims**

1. Verfahren zur Isolierung von Schwammkollagen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Ausgangsmaterial in Alkohol einlegt, anschliessend wäscht, mit einem Extraktionsmittel behandelt, und den so erhaltenen Kollagenextrakt aufarbeitet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Schwammkollagen aus marinen Schwämmen isoliert.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Schwammkollagen aus Demospongiae, bevorzugt Chondrosiidae, isoliert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Alkohol Ethanol verwendet.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass man als Extraktionsmittel basische Puffersysteme, bevorzugt Tris-Puffer, verwendet.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass man das Extraktionsmittel im Überschuss bezogen auf die Gewichtsmenge an Schwamm- Ausgangsmaterial einsetzt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Aufarbeitung den pH-Wert des Kollagenextraktes erhöht, die Suspension rührt, zentrifugiert, den Überstand ansäuert und das Präzipitat isoliert.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass man das isolierte Kollagenprodukt gefriergetrocknet.
9. Verwendung eines Kollagenproduktes, hergestellt nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-8 zur Herstellung eines kosmetischen, medizinischen oder pharmazeutischen Mittels für die topische, intravenöse, intramuskuläre oder orale Anwendung.
10. Verfahren zur Herstellung von nanopartikulärem Kollagen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Ausgangskollagenmaterial dispergiert und homogenisiert, anschliessend emulgiert und mit einem Überschuss an Vernetzungsmittel vernetzt und anschliessend aufarbeitet.
11. Verfahren gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Ausgangsmaterial ein Kollagenprodukt, hergestellt nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-8 einsetzt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Kollagen, erhalten aus Schwämmen der Klasse der Chondrosiidae nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-8 einsetzt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-12, dadurch gekennzeichnet, dass man Kollagen mit einer Partikelgrösse von 150 nm bis 3  $\mu$ m herstellt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-13, dadurch gekennzeichnet, dass man als Vernetzungsmittel Glutardialdehyd einsetzt.
15. Verwendung eines Kollagenproduktes, hergestellt nach einem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 10-14 zur Herstellung eines kosmetischen, medizinischen oder pharmazeutischen Mittels für die topische, intravenöse, intramuskuläre oder orale Anwendung.
16. Kollagen, erhalten nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-8 oder 10-14.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



Figur 1



Figur 2